

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Ivana Čurnová

Interakce patogenních bakterií rodu *Bordetella* s hostitelskými buňkami

Interaction of pathogenic *Bordetella* species with host cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Denise Petráčkové, Ph.D. za její čas, který mi při psaní bakalářské práce věnovala a během kterého mi trpělivě a ochotně pomáhala. Děkuji také Laboratorii post-transkripční kontroly genové exprese (MBÚ AV ČR, v.v.i.) a své rodině za pomoc a vytvoření příjemných podmínek pro psaní této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2020

Podpis:

Abstrakt

Většina zástupců rodu *Bordetella* vyvolává ve svých hostitelích závažná respirační onemocnění. *B. pertussis* a některé kmeny *B. parapertussis* jsou striktně lidské patogeny a způsobují onemocnění zvané černý kašel. Černý kašel je vysoce nakažlivé onemocnění, které je v posledních desetiletích na vzestupu i v řadě vyspělých zemí s vysokou mírou proočkovanosti. Proto je studium a pochopení interakcí mezi hostitelem a *B. pertussis* zásadní. Při kolonizaci hostitele a modulaci jeho imunitní odpovědi hrají důležitou roli faktory virulence, které jsou u *B. pertussis* většinou regulovány dvoukomponentovým systémem BvgAS. Při studiu vztahu hostitel-patogen se využívají jak *in vitro*, tak i *in vivo* infekční modely, které se vzájemně vhodně doplňují. Nedávno zveřejněné práce ukazují, že tento patogen je schopen po určitou dobu přežívat v lidských a myších fagocytech a mohl by být proto považován za fakultativní intracelulární patogen. Navíc je možné, že intracelulární fáze umožňuje *B. pertussis* uniknout imunitnímu systému, přežívat v hostiteli a případně být zdrojem další nákazy. Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky týkající se vztahu patogenní bakterie *B. pertussis* a jejího hostitele se zaměřením na *in vitro* a *in vivo* infekční modely. Pozornost je věnována zejména adaptaci patogenu v průběhu infekce a zapojení faktorů virulence v jednotlivých fázích infekce.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, faktory virulence, Bvg, infekční modely, intracelulární patogen, imunitní odpověď

Abstract

Most of the members of the Gram-negative genus *Bordetella* cause severe infections of the respiratory tract in their hosts. *B. pertussis* and specific lineages of *B. parapertussis* infect humans and cause the disease known as whooping cough, a highly contagious respiratory disease that is currently on the rise even in highly vaccinated populations. Therefore, a more detailed understanding of the *B. pertussis* interactions with the host is crucial. *B. pertussis* produces a great variety of virulence factors, majority of which is regulated by the two-component BvgAS system. These factors assist the pathogen in the colonization of the host and evasion of the host immune system. The studies on host-pathogen interactions use both *in vitro* and *in vivo* infection models, which complement each other appropriately. Recently, it was demonstrated that *B. pertussis* escape killing and persists in macrophages, suggesting that *B. pertussis* can be considered as a facultative intracellular pathogen. This ability may allow the pathogen cells to persist within the host and potentially spread to the new host. The aim of this bachelor thesis was to summarize the knowledge on the host-pathogen interactions between *B. pertussis* and its host with focus on *in vitro* and *in vivo* infection models. The attention is paid especially to the adaptation of the pathogen during infection and to the requirement of virulence factors for different phases of infection.

Key words: *Bordetella pertussis*, virulence factors, Bvg, infectious models, intracellular pathogen, immune response

Seznam zkratek

AC	a dynylate c yclase d omain	adenylát cyklázová doména
ACT	a dynylate c yclase t oxin	adenylát cyklázový toxin
ADP	a denosine d iphosphate	adenosindifosfát
aP	a cellular p ertussis vaccines	acelulární pertusová vakcína
APC	a ntigen- p resenting c ell	antigen prezentující buňka
ATP	a denosine t riphosphate	adenosintrifosfát
BPZE1	live-attenuated pertussis vaccine	typ vakcíny proti černému kašli
Bvg	<i>Bordetella</i> virulence gene	gen virulence <i>Bordetelly</i>
cAMP	c yclic a denosine m onophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CD	c luster of d ifferentiation	skupina povrchových markerů buněk
CR	c omplement r eceptor	receptor komplementu
CRD	c arbohydrate r ecognition d omain	sacharidy rozpoznávající doména
DC	d endritic cell	dendritická buňka
DNT	d ermonecrotic t oxin	dermonekrotický toxin
FHA	f ilamentous h emagglutinin	filamentózní hemagglutinin
Fim	f imbrie	fimbrie
GM-CSF	g ranulocyte- m acrophage c olony- s timulating f actor	typ faktoru stimulující diferenciaci
GTP	g uanosine t riphosphate	guanosintrifosfát
IFN	i nterferon	interferon
IL	i nterleukin	interleukin
LPS	l ipopolysaccharide	lipopolysacharid
M-CSF	m acrophage c olony-stimulating f actor	typ faktoru stimulující diferenciaci
MHC	m ajor h istocompatibility c omplex	hlavní histokompatibilitní komplex
MH-S	cell line of murine alveolar macrophages	buněčná linie myších alveolárních makrofágů
NAD	n icotinamide a denine d inucleotide	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	n icotinamide a denine d inucleotide p hosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAMP	p athogen- a ssociated m olecular p atterns	molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenů
PMA	P horbol-12- m yristate-13- a cetate	forbol-12-myristát-13-acetát
PRN	p ertaktin	pertaktin
PTX	p ertussis t oxin	pertusový toxin
rRNA	r ibosomal R NA	ribozomální RNA
T3SS	T ype III secretion system	sekreční systém typu 3
TCT	t racheal cytotoxin	tracheální cytotoxin
Th	T helper cells	pomocné T lymfocyty
VLA	v ery late antigen	velmi pozdní antigen
WHO	W orld H ealth O rganization	světová zdravotnická organizace
wP	w hole-cell p ertussis vaccine	celobuněčná pertusová vakcína

Obsah

1	Úvod	1
2	Bakterie rodu <i>Bordetella</i>	2
2.1	Lidské patogeny rodu <i>Bordetella</i>	2
3	Bakteriální mechanismy zapojené při infekci <i>Bordetella</i> spp.....	4
3.1	Faktory virulence podílející se na kolonizaci hostitele	4
3.2	Modulace imunitního systému hostitele	7
3.2.1	Vliv vakcinace	9
3.3	Regulace virulence systémem BvgAS	11
3.4	Regulace virulence systémem RisAK	14
4	Modely vhodné ke studiu patogenních organismů.....	15
4.1	<i>In vitro</i> infekční modely	15
4.1.1	Lidské primární buněčné monocytární linie.....	16
4.1.2	THP-1 buňky	17
4.1.3	Myší fagocytární buňky	18
4.1.4	Epiteliární buněčná linie A549.....	18
4.1	<i>In vivo</i> infekční modely (zvířecí modely).....	19
4.1.1	Zvířecí model - myš.....	19
4.1.2	Zvířecí model - prase	21
4.1.3	Zvířecí model - pavíán.....	21
5	Závěr	23
6	Přehled použité literatury	24

1 Úvod

Zástupci rodu *Bordetella* patří mezi lidské a zvířecí patogeny, které způsobují celou řadu respiračních onemocnění. Významným zástupcem této skupiny je *Bordetella pertussis*, která způsobuje u lidí závažné respirační onemocnění - černý kašel. Blízce příbuzný druh, *B. parapertussis*, je také lidským patogenem, nicméně s mírnějším průběhem onemocnění. Dostupné očkování proti *B. pertussis* ovšem neposkytuje ochranu proti tomuto příbuznému druhu.

Onemocnění černým kašlem se v posledních desetiletích zvyšuje i přes vysokou míru proočkovanosti populace převážně ve vyspělých zemích. Ukazuje se, že viníkem by mohla být v současnosti používaná acelulární vakcína, která obsahuje pouze vybrané bakteriální antigeny. Tato vakcína má nižší reaktivitu než původní celulární vakcína, ale neposkytuje dlouhodobou ochranu a vede k selekci kmenů *B. pertussis*, které vybrané faktory virulence neprodukují. Porozumění interakce mezi patogenem a hostitelem, zvláště mezi imunitním systémem a bakterií *B. pertussis*, by mohlo výrazně přispět ke zlepšení vakcíny, případně i k cílenější léčbě onemocnění. Navíc se ukazuje, že bakterie disponuje i schopností intracelulárního přežívání v buňkách imunitního systému, či v epiteliálních buňkách. Tato schopnost může vést k persistenci patogena v hostiteli a komplikovat tak léčbu.

Ke studiu interakcí mezi *B. pertussis* a hostitelem se používají jak zvířecí modely (*in vivo*), tak tkáňové kultury (*in vitro*). Mezi běžně používané *in vivo* modely patří pokusy na laboratorních myších (např. BALB/c kmen). V omezené míře se využívají i větší zvířata jako prasata či paviáni. Nicméně tyto modely jsou náročnější a finančně nákladnější. Zvířecí modely se více přibližují reálným podmínkám při infekci, ale většinou jsou prováděny v menším počtu a v případě bakterie *B. pertussis* nejsou přirozenými hostiteli. V rámci omezování pokusů na zvířatech a také z praktických důvodů se hojně využívají *in vitro* modely, tedy experimenty prováděné s buněčnými kulturami (např. primární monocyty/makrofágy z lidských pacientů, nebo standardizované monocytární buněčné linie THP-1). Jejich využití je vždy závislé na schématu infekčního experimentu, protože obě možnosti mají své kladné i záporné stránky.

Tato bakalářská práce se snaží shrnout poznatky o faktorech virulence zapojených při účinné kolonizaci hostitele s ohledem na jednotlivé fáze infekce a zaměřuje se také na používané *in vivo* a *in vitro* modely. Pochopení vztahu mezi patogenem a hostitelem při infekci je velmi důležité, protože může pomoci vylepšit dosavadní vakcínu, či urychlit nebo zefektivnit léčbu černého kašle.

2 Bakterie rodu *Bordetella*

Bakterie rodu *Bordetella* jsou gramnegativní kokobacily patřící do čeledi *Alcaligenaceae* osidlující nejrůznějších biotopy, byly izolovány např. v jeskynních sedimentech, z vody, půdy nebo rostlin. Rod *Bordetella* obsahuje i celou řadu významných zvířecích či lidských patogenů.

Vyšší mírou genetické diverzity disponují hlavně nepatogenní druhy, u kterých se předpokládá, že představují evoluční předky zvířecích a lidských patogenů. Srovnání bylo provedeno na základě sekvenční analýzy bakteriální 16S rRNA, kde u patogenních, na zvířata specializovaných druhů, byl zjištěn nižší stupeň diverzity, než u druhů izolovaných z prostředí. Některé patogenní druhy si také ponechávají schopnost růstu v půdě naznačující jejich vznik z nepatogenních druhů (Hamidou Soumana *et al.* 2017).

Mezi nejvíce studovanou skupinu bakterií rodu *Bordetella* patří tzv. „klasické druhy“ jako *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*. Tyto druhy infikují dýchací cesty savců a lidí, proto je jejich studiu věnována největší pozornost.

2.1 Lidské patogeny rodu *Bordetella*

Nejznámějším lidským patogenem z této skupiny je druh *Bordetella pertussis*, u kterého není znám žádný jiný přirozený rezervoár (Mattoo *et al.* 2001) Tato bakterie způsobuje onemocnění zvané černý kašel neboli pertuse s charakteristickým typem kašle (Bednář *et al.* 1999).

Bakterie *B. pertussis* je gram negativní, nepohyblivá tyčinka ovoidního tvaru. Jedná se o striktně lidský patogen šířící se kapénkovou infekcí, který v hostiteli osidluje epitelální řasinky dýchacích cest a způsobuje vysoce nakažlivé onemocnění černý kašel (Bednář *et al.* 1999). Podle informací WHO bylo za rok 2018 zaznamenáno 151 074 případů nákazy na celém světě a odhadovaný počet úmrtí způsobený touto bakterií je kolem 89 000.

Tato bakterie byla objevena v roce 1906 Bordetem a Gengou (Bordet a Gengou, 1906; cit. dle Mattoo a Cherry, 2005), nicméně onemocnění černý kašel bylo popsáno již Balloniusem v 16. století v Paříži. Jedná se o krátkou nepohyblivou tyčinku ovoidního tvaru, která v hostiteli osidluje řasinkový epitel v dýchacích cestách.

Hlavním příznakem této nemoci je prudký kašel, který může trvat 4-8 týdnů. První příznaky se dostaví zhruba týden po infekci. Zahrnují rýmu a kašel doprovázené mírnou horečkou. Toto období se nazývá katarální fází. Následuje fáze paroxysmální, která je nejznámější. Projevuje se vysoce dráždivým kašlem, který někdy může způsobit až apnoické

pauzy. Posledním stádiem je období rekonvalescence, při kterém dochází k snížení frekvence záchvatů a zklidnění kašle (Votava, 2003).

Dalším druhem způsobující onemocnění u člověka je ***Bordetella parapertussis***, počet případů infikovaných tímto patogenem je však výrazně nižší. Pro srovnání, v roce 2014 se v České republice nakazilo 2521 lidí *B. pertussis* a 95 jedinců *B. parapertussis* (Fabiánová *et al.* 2015). Tento druh byl původně považován za obligátně lidského patogena, později však bylo zjištěno, že tato bakterie má 2 linie. Lidská linie způsobuje mírnější projev nemoci obdobný černému kašli. Druhá linie napadá dýchací cesty ovcí. Byla zjištěna i odlišnost v genetické informaci bakterií izolovaných z ovcí z Nového Zélandu a Skotska, a odhalena poměrně velká genetická diverzita u tohoto druhu bakterie (Porter *et al.* 1996). Při bližším zkoumání lidské linie se zjistilo, že podobně jako *B. pertussis* jsou produkovány proteiny filamentózní hemagglutinin (FHA) a pertaktin (PRN), naopak pertusový toxin (PTX) chybí (Bergfors *et al.* 1999).

Na základě molekulárně genetické analýzy bylo zjištěno, že druhy *B. pertussis* a *B. parapertussis* se vyvinuly nezávisle na sobě z druhu *B. bronchiseptica* (Parkhill *et al.* 2003). Bakterie ***Bordetella bronchiseptica*** je primárně zvířecím patogenem, napadá dýchací cesty různých druhů malých savců např. koček, psů, králíků, opic, fretek (Goodnow *et al.* 1980). Vzácně však může dojít i k infekci lidí, a to především starších osob, či jedinců s oslabenou imunitou, nebo trpících chronickým onemocněním dýchacích cest (Ducours *et al.* 2017).

Obecně se bakterie v hostitelském organismu musí vypořádat jak s reakcí imunitního systému (např. komplement), či uniknout fagocytóze, nebo specifické imunitě. Produkce faktorů virulence napomáhá patogenním bakteriím překonat tyto obranné mechanismy hostitele.

3 Bakteriální mechanismy zapojené při infekci *Bordetella* spp.

Bakterie rodu *Bordetella* disponují celou řadou faktorů virulence, které jim umožňují úspěšnou kolonizaci a následné přežívání v hostiteli. Identifikace těchto faktorů a správné porozumění mechanismu jejich účinku je základním předpokladem pro úspěšný vývoj vakcín. Bakterie rodu *Bordetella* mají shodnou většinu faktorů virulence a s výhodou se tak mohou pro studium procesu infekce používat i jiné druhy. Hojně se využívá *B. bronchiseptica*, která narozdíl od *B. pertussis* napadá dýchací cesty malých savců a studie na zvířecích modelech jsou přirozené.

Po vniknutí bakterie do organismu se průběh kolonizace hostitele dá rozdělit do 4 fází: přichycení na epitelální buňky a modulace imunitní odpovědi hostitele, překonání imunitního systému, případné poškození tkáně a doprovodné projevy onemocnění (Mattoo a Cherry, 2005).

3.1 Faktory virulence podílející se na kolonizaci hostitele

Kritickým bodem po průniku bakterie do dýchacího traktu hostitele je její úspěšné fyzické připojení na epitelální buňky případně interakce s imunitními buňkami, které se zde nacházejí. Přehledný schématický obrázek faktorů virulence (adheziny a toxiny), jimiž *B. pertussis* disponuje ukazuje **Obr.1**.

První kontakt bakterie s povrchem hostitelských buněk je zprostředkován pomocí adhezínů, které jsou komponentami buněčného povrchu bakterie.

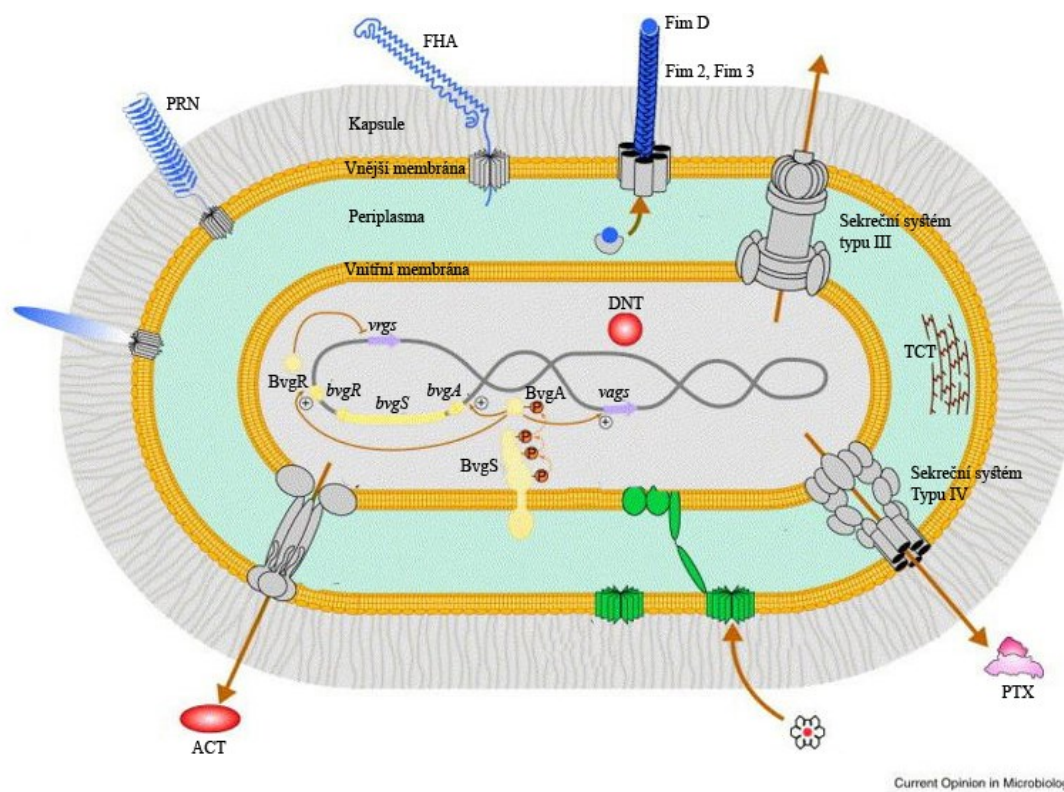
Hlavním adhezinem je **filamentózní hemaglutin (FHA)**, který je mimo jiné i důležitou složkou vakcíny proti černému kašli. Tento protein se RGD doménou (motiv Arg-Gly-Asp) váže na receptor CR3 (také známý pod názvem integrinový receptor $\alpha_M\beta_2$, složený z podjednotek CD11b a CD18). CR3 se vyskytuje na povrchu alveolárních makrofágů a dalších leukocytů (Relman *et al.* 1990). Navíc se FHA pomocí domény CRD (carbohydrate recognition domain) může vázat na glykoproteiny obsahující galaktosu, což jsou např. buňky řasinkového epitelu a také makrofágy (Prasad *et al.* 1993).

FHA je důležitý nejen pro vazbu bakterií k buňkám hostitele, ale hraje důležitou roli také při tvorbě biofilmu a tím vytváření mikrokolonií v dýchacím traktu hostitele (Serra *et al.* 2011). Obecně tato trojrozměrná struktura napomáhá bakteriím efektivně přežít za nepříznivých podmínek. Biofilmová matrix bakterie chrání, nicméně jde o flexibilní strukturu. FHA protein se vyskytuje na povrchu bakterie, může však dojít k jeho uvolnění působením proteázy SphB1, což má za následek uvolnění bakterií z mikrokolonie a osídlení nového místa dýchacího traktu. Zvyšuje se tak úspěšnost kolonizace hostitele (Coutte *et al.* 2001, Coutte *et al.* 2003). Tvorbu

biofilmu podmíněnou FHA inhibuje adenylát cyklázový toxin (ACT) a naopak snížení produkce ACT by mohlo být jedním z mechanismů, které tvorbu biofilmu iniciují (Hoffman *et al.* 2016).

Protein FHA je propojený s dalším adhezinem produkovaným *B. pertussis*, s **fimbriemi** (Fim). *B. pertussis* tvoří dva typy fimbrií – Fim2 a Fim3, které mohou být součástí i některých acelulárních vakcín (Gorringe a Vaughan, 2014). Oba typy fimbrií obsahují další malou podjednotku FimD, která je důležitá pro navázání bakterie na monocyty přes VLA-5 integrin na jejich povrchu. Tato vazba aktivuje receptor CD3, který je potřebný pro navázání filamentózního hemagglutinu (FHA) adhezinu, čímž se zvyšuje úspěšnost kolonizace hostitele (Hazenbos *et al.* 1995). Naopak na neutrofily, které exprimují mnohem méně integrinu VLA-5, se fimbrie neváží (Hazenbos *et al.* 1993). Fimbrie jsou ale také velmi důležité pro kolonizaci řasinkového epitelu v průduškách a průdušnici (Scheller *et al.* 2015). Tato kolonizace je pravděpodobně zprostředkována díky velké fimbriální podjednotce Fim2 (Geuijen *et al.* 1998), kterou se *B. pertussis* váže na sulfatované cukry (např. heparin sulfát, chondroitin sulfát či dextran sulfát), běžně se vyskytující na epiteliálních buňkách dýchacího traktu (Geuijen *et al.* 1996).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že podobně jako FHA a Fim, jež přispívají k přichycení bakterií na buňky hostitele, tak i další adhezin **pertaktin** (PRN) má tuto funkci a podobně jako FHA se přes RGD doménu váže na hostitelské buňky a naopak jeho absence vede ke snížené adherenci (Leininger *et al.* 1991). Studie Inatsuka a kol. v roce 2010, která se zabývala druhem *B. bronchiseptica*, však naznačuje, že v prvotním procesu přichycení bakterie není pertaktin vyžadován a jeho hlavní role je až v další fázi kolonizace (viz **Kap. 3.2.**).



Obr. 1: Buňka bakterie *Bordetella pertussis* obalená kapsulou s vyznačenými faktory virulence, kterými bakterie může disponovat. Buňka *B. pertussis* se skládá z vnitřní a vnější membrány, prostorem mezi membránami (periplazmou) a obalem (kapsulí). Na obrázku jsou dále znázorněny hlavní faktory virulence, kterými buňka disponuje. Adheziny, mezi které patří filamentózní hemagglutinin (FHA), fimbrie (Fim) a pertaktin (PRN), jsou znázorněny modře. Toxiny, mezi které patří pertusový toxin (PTX), adenylát cyklázový toxin (ACT), tracheální cytotoxin (TCT) a dermonekrotický toxin (DNT) červeně. Pomocné proteiny šedě – nejznámějšími jsou proteiny sekrečního systému typu III a IV, a regulačního systému – BvgA, BvgS. BvgR – béžově. Šipky znázorňují regulaci exportu a importu faktorů virulence. Převzato a upraveno: (Locht *et al.* 2001)

Pro úspěšnou kolonizaci a přetrvání bakterie v dolních dýchacích cestách je důležité i působení sekrečního systému III (T3SS). Komponenty T3SS vytváří jehle podobný útvar, který umožňuje kontakt s membránou napadené buňky a sekreci efektorů do napadené buňky. Funkce tohoto systému je nejvíce studována na modelu *B. bronchiseptica*, kde způsobuje změnu chování dendritických buněk. Dendritické buňky sice migrují do lymfatických uzlin, ale v nich vyvolávají imunosupresivní imunitní odpověď, charakteristickou sníženou produkcí IFN γ a zvýšenou produkcí IL-10, který je zásadní pro dlouhodobou kolonizaci hostitele (Skinner *et al.* 2005). Tímto mechanismem je umožněna perzistence bakterií *B. bronchiseptica* v plicích myši (Pilione a Harvill 2006). Fennely a kol. v roce 2008 publikovali první důkaz funkčního T3SS systému u *B. pertussis*, který je podobně jako u *B. bronchiseptica* zodpovědný za pozměněnou imunitní odpověď hostitele. Působením T3SS dochází ke zvýšení adherence bakterií k makrofágům, potlačení zánětlivých reakcí v těle hostitele nebo snížené indukci Th1 či Th17 imunitní odpovědi (viz **Kap. 3.2.1**). Tyto kroky vedou k úspěšné kolonizaci dýchacích cest hostitele.

3.2 Modulace imunitního systému hostitele

Neméně důležitou fází je po úspěšném přichycení bakterie na hostitelský organismus také překonání jeho obrany. Modulace imunitní odpovědi je důležitým krokem v úspěšném přežití v hostiteli. Pro tuto funkci jsou důležité produkované bakteriální toxiny, proteiny T3SS, případně i adheziny, které plní více funkcí.

Právě v případě adhezínů se předpokládalo, že hrají roli jen v přichycení bakterie na hostitelské buňky. Nicméně u novorozenců očkovanych acelulární vakcínou proti *B. pertussis* se ukázalo, že adhezín FHA (základní složka acelulární vakcíny) může přispívat i k potlačení zánětlivé reakce spojené se zvýšenou produkcí IL-10 a následnou sníženou sekrecí IFN γ , která vede k horšímu odstranění bakterie z těla (Dirix *et al.* 2009). Role adhezínů FHA a Fim se v potlačení zánětu se prokázala i na myších modelech infikovaných *B. bronchiseptica* (Scheller *et al.* 2015).

Důležitou roli hraje i pertaktin (PRN), který pomáhá růstu bakterií a snižuje obranou schopnost neutrofilů přítomných v místě zánětu. Vliv neutrofilů při obraně proti *B. bronchiseptica* se ukázal jako podstatný, u neutropenických myší infekce bakterií způsobila smrtelné onemocnění (Inatsuka *et al.* 2010).

Pro přežití bakterie v těle hostitele je velmi důležitá produkce toxinů. Jedním z nejznámějších toxinů produkovaný rodem *Bordetella* je **adenylát cyklázový toxin** (ACT), který hraje roli hlavně v prvotní fázi kolonizace respiračního traktu (Goodwin a Weiss, 1990). Váže se především na buňky nesoucí CR3 receptory (α M β , CD11b/CD18), které se vyskytují na povrchu makrofágů, neutrofilů či dendritických buněk (Guermonprez *et al.* 2001).

Po vazbě ACT na receptor CD11b dojde vytvoření „translokačního intermediátu“, který se začíná zanořovat do membrány. Membránová translokace adenylát cyklázové domény (AC) je doprovázená vtokem Ca²⁺ iontů z prostředí do buňky (Fišer *et al.* 2007). Tok Ca²⁺ iontů do buněk aktivuje štěpení talinu (proteinu spojující aktinový cytoskelet s CR3 receptorem) pomocí Ca²⁺ dependentní proteázy - kalpainu. Vzniklý komplex zahrnující ACT a CR3 receptor se přesouvá do oblasti lipidových raftů, kde pak dochází k translokaci AC domény do buňky (Rogel a Hanski 1992; Bumba *et al.* 2010). V cytosolu se na translokovanou N-koncovou část AC domény váže kalmodulin. Tuto vazbu stabilizují Ca²⁺ ionty a motiv *loop-helix-loop* na C-terminální části, následně dojde k aktivaci adenylát cyklázové aktivity, která vede k přeměně ATP na cAMP (Selwa *et al.* 2014).

Zvýšení koncentrace cAMP má mnoho negativních dopadů na buňku. Dochází například k inhibici RhoA GTPázy a k aktivaci proteinu kofilinu, jež se podílí na formování cytoskeletu

v buňce, to má za následek přeskupení aktinového cytoskeletu doprovázeného zvlněním makrofágů a sníženou schopností fagocytózy (Kamanová *et al.* 2008). Tvorba cAMP dále způsobuje inhibici tvorby oxidu dusného zprostředkovanou aktivací SHP-1 tyrozin fosfatázy v makrofázích, která hraje důležitou roli v obraně a odstranění bakterie z hostitele (Černý *et al.* 2015). Produkce cAMP narušuje také funkci neutrofilů. Blokuje oxidační vzplanutí a inhibuje produkci reaktivních forem kyslíku. To může být způsobeno aktivací SHP-1 tyrozin fosfatázy podobně jako u makrofágů, nebo aktivací Epac (Exchange protein directly activated by cAMP), který inaktivuje fosfolipázu C a protein kinázu C, jež jsou potřebné k aktivaci NADPH oxidázy (Černý *et al.* 2017). Na NADPH oxidáze je závislá i tvorba neutrofilních sítí v mezibuněčném prostoru důležitých pro boj s patogeny (Eby *et al.* 2014). Neutrofilní sítě vznikají uvolněním chromatinu z neutrofilů a slouží k zachycení velkého množství bakterií, které mohou být následně fagocytovány dalšími fagocyty. Působením ACT také dochází k vyvolání apoptózy u makrofágů (Khelef *et al.* 1993), naopak u neutrofilů ji inhibuje, protože ACT potlačuje vznik neutrofilních sítí (Eby *et al.* 2014). Všechny zmíněné mechanismy působení ACT mohou být důležité při zahájení infekce a přežití bakterie v organismu.

Dalším významným toxinem produkovaným *B. pertussis* je **pertusový toxin** (PTX). Řadí se mezi AB toxiny, protože se skládá ze 6 podjednotek: S2-S5 podjednotky, které tvoří B oligomer vazebnou část, a S1 podjednotky, která je nazývána A, aktivní část. PTX vzniká v bakteriální buňce jako holotoxin a je z buňky vylučován pomocí systému Ptl (pertussis toxin liberation), který patří do rodiny transportérů sekrečního systému typu IV (**Obr. 1**), (Farizo *et al.* 2000). B oligomerem se PTX naváže na povrchové glykoproteiny buněk dýchacího traktu a endocytózou se dostává dovnitř, kde je poté retrográdní cestou veden přes Golgiho aparát do endoplazmatického retikula (Plaut a Cabonetti, 2008). V endoplazmatickém retikulu dojde za účasti ATP k odštěpení aktivní podjednotky A (Kreuger a Barbieri, 1993), která se dostává do cytosolu, zde přenáší ADP-ribózu z NAD na C-konec α podjednotky membránových trimerních G proteinů. Následná neschopnost disociace podjednotek G proteinů vede k narušení signálních drah - k permanentní aktivaci adenylát cyklázy, tím zvýšení produkce cAMP, deregulaci iontových kanálů a blokaci fosfolipázy C (Katada *et al.* 1983).

Působení PTX má velký význam pro přežití bakterií v dolních dýchacích cestách během prvotní fáze infekce. Na myším modelu se zjistilo, že PTX inhibuje přesun neutrofilů do dýchacích cest, které jsou důležité pro fagocytózu opsonizovaných bakterií (Kirimanjeswara *et al.* 2005). Také se ukázalo, že působením pertusového toxinu dochází k intenzivnějším a dlouhodobějším zánětlivým reakcím vyvolanými bakteriemi v dýchacích cestách myši (Conelly *et al.* 2012). PTX pravděpodobně hraje důležitou roli i v dalších modulacích

vrozeného imunitního systému hostitele během počáteční kolonizace dýchacího traktu (Carbonetti *et al.* 2003 a 2007).

Zvýšená produkce cAMP, změny fyziologie hostitelské buňky a působení bakteriálních proteinů T3SS přispívají k poškození epitelálních buněk dýchacího traktu a projevům onemocnění ve formě kašle, který je typický pro poslední fázi kolonizace hostitele bakterií *B. pertussis*. Tomu přispívá také působení **tracheálního cytotoxinu** (TCT), který způsobuje uvolňování prozánětlivého IL-1, což vede k nadprodukci oxidu dusného spojené s poškozením řasinkového epitelu dýchacích buněk (Flak a Goldman, 1999; Heiss *et al.* 1993).

3.2.1 Vliv vakcinace

Imunitní systém hostitele se umí velmi rychle a účinně bránit proti infekci vyvolané *B. pertussis*, k obraně velkým podílem přispívá adaptivní imunita. Adaptivní imunita ovšem není plně vyvinutá u novorozenců a mladých jedinců. V kombinaci s chybějícím očkováním může infekce *B. pertussis* u dětí vyvolat závažnější onemocnění končící i smrtí. Následné projevy onemocnění můžou být spojeny se zápallem plic, respiračním selháním, leukocytózou, nekrotizující bronchitidou či poškozením sliznice průdušnic a ztrátou řasinek (Paddock *et al.* 2008).

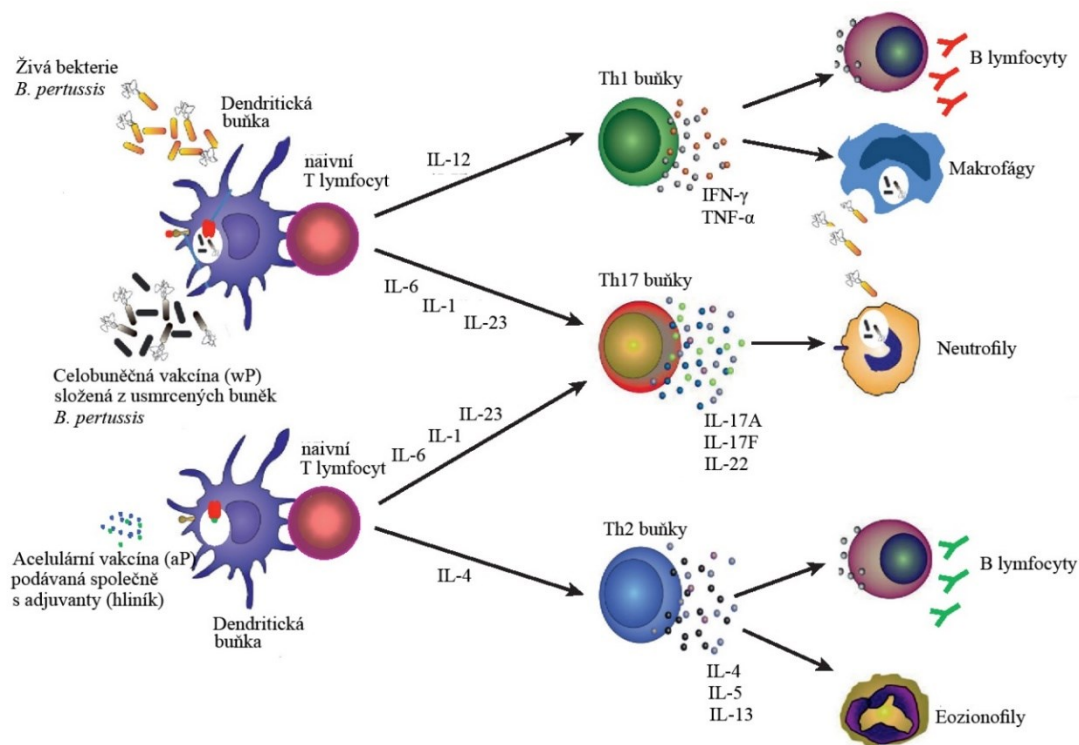
Během infekce *B. pertussis* kolonizuje dýchací trakt hostitele, vyskytuje se na řasinkovém epitelu (Bednář *et al.* 1999), ale může přežívat i intracelulárně v epiteliárních buňkách řasinkového epitelu či v alveolárních makrofázích (Paddock *et al.* 2008).

K aktivaci imunitní odpovědi dochází díky přítomnosti PAMP molekul (molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenních mikroorganismů). U G⁻ bakterií se jedná především o lipopolysacharidy (LPS), které se váží na Toll-like receptory typu 4, případně i jiné typy receptorů, za přítomnosti koreceptoru MD-2 na povrchu imunitních buněk (Shimazu *et al.* 1999). U G⁺ jsou PAMP molekulami např. peptidoglykany. Do kategorie PAMP molekul lze zařadit i některé faktory virulence. U *B. pertussis* ke stimulaci Th1 buněk přispívá např. PTX, který vede k dozrávání dendritických buněk. Tyto buňky poté začnou produkovat IL-12 podporující indukci Th1 imunitní odpovědi, která je charakteristická produkcí IFN γ (Hou *et al.* 2003). PTX se podílí i na stimulaci Th17 imunitní odpovědi přes prozánětlivé cytokiny, např. IL-6, vedoucí k produkci cytokinu IL-17 (Andreasen *et al.* 2009).

Od 20. století bylo zavedeno očkování celobuněčnou vakcínou (wP) obsahující oslabenou či usmrcenou bakterii *B. pertussis*. Jak je vidět na **Obr. 3**, wP vakcína vyvolává obdobnou buněčnou odpověď jako samotná infekce bakterií *B. pertussis*, tedy buněčnou odpověď

spojenou s aktivací naivních T lymfocytů a jejich diferenciaci na Th1 a Th17 lymfocyty (Ross *et al.* 2013). Tato vakcína se ale vyznačuje vysokou reaktogenitou a z tohoto důvodu byla nahrazena novou acelulární vakcínou (aP) obsahující 3 – 5 antigenů z *B. pertussis*, mezi které patří PTX, FHA, PRN a v některých typech je doplňují ještě Fim2 a Fim3 (Miller *et al.* 1991). Na rozdíl od wP vakcíny acelulární vakcína vyvolává především Th2 a částečně Th17 imunitní odpověď, (Obr. 3), (Ross *et al.* 2013).

Imunitní odpověď vyvolaná aP vakcínou je odlišná, má nižší účinnost a kratší délku ochrany poskytující očkovanému při srovnání s celobuněčnou vakcínou. To může být jeden z důvodů zvýšení počtu infikovaných jedinců a nárůstu onemocnění v posledních letech (Schwartz *et al.* 2016). Očkování acelulární vakcínou může také vést k selekci nových kmenů patogena, na které imunitní systém hostitele hůře reaguje. Příkladem může být patogenní kmen *B. pertussis* obsahující alelu PtxP3, který je u lidí více virulentní než původní kmen obsahující alelu PtxP1 (Mooi *et al.* 2009). Kromě toho pravděpodobně v důsledku používání acelulární vakcíny došlo k selekci kmenů *B. pertussis* neobsahujících PRN (Martin *et al.* 2015). Tento PRN negativní kmen může být zároveň FHA negativní (Xu *et al.* 2019). U těchto kmenů je následná kolonizace hostitele naočkováného acelulární vakcínou úspěšnější, protože zde nedochází k navázání protilátky na PRN a následné fagocytóze (Hellwig *et al.* 2003).



Obr.3: Indukce imunitní odpovědi na celobuněčnou (wP) a acelulární (aP) vakcínu. Celobuněčná vakcína aktivuje naivní CD4⁺ T lymfocyty a aktivuje Th1 + Th17 imunitní odpověď důležitou především pro intracelulární eliminaci bakterie. Acelulární vakcína aktivuje hlavně Th2 imunitní odpověď, v menší míře i Th17. Pro lepší imunitní odpověď se podává společně s adjuvanty (Mills *et al.* 2014)

V současné době se vyvíjí nová vakcína, která by účinně chránila proti infekci *B. pertussis* a zároveň neměla výrazné vedlejší účinky. Takovou vakcínou by mohla být vakcína BPZE1, složená ze živých oslabených bakterií. Působením této vakcíny dochází ke zvýšené baktericidní aktivitě neutrofilů a produkci protilátek proti ACT, které mohou přispívat k lepšímu odstranění bakterie z organismu (Lin *et al.* 2020).

3.3 Regulace virulence systémem BvgAS

Nejvýznamnějším regulačním systémem *B. pertussis* je dvoukomponentový systém **BvgAS**. Exprese faktorů virulence u tohoto systému je regulovaná pomocí genového lokusu *bvg*, který kóduje proteiny BvgS, BvgA a BvgR. Regulace BvgAS systému je řízena změnou vnějších podmínek, jak ukazuje **Obr. 2 (A)**. Při aktivaci dochází k autofosforylaci *transmitter* domény BvgS v pozici histidinu 729, tím je zahájena kaskáda přenosu fosfátu, nejprve na aspartát *reciever* domény a z něj na histidin *histidin-fosfotransferové* domény BvgS proteinu. Kaskáda končí přenosem fosfátu na BvgA protein konkrétně na aspartát 54. Tento fosforylovaný aktivovaný solubilní protein pak slouží jako aktivátor transkripce velkého množství genů obecně nazývaných *vags* (*virulence-activated genes*). Popsaná funkce je umožněna díky motivu *helix-turn-helix* (HTH) na C-terminálním konci proteinu BvgA. Motiv HTH je pak klíčovým regulačním faktorem genů aktivovaných systémem BvgAS (Uhl a Miller, 1994; Uhl a Miller, 1996a). Naopak defosforylace BvgS vede k následné inaktivaci BvgA (Uhl a Miller, 1996b).

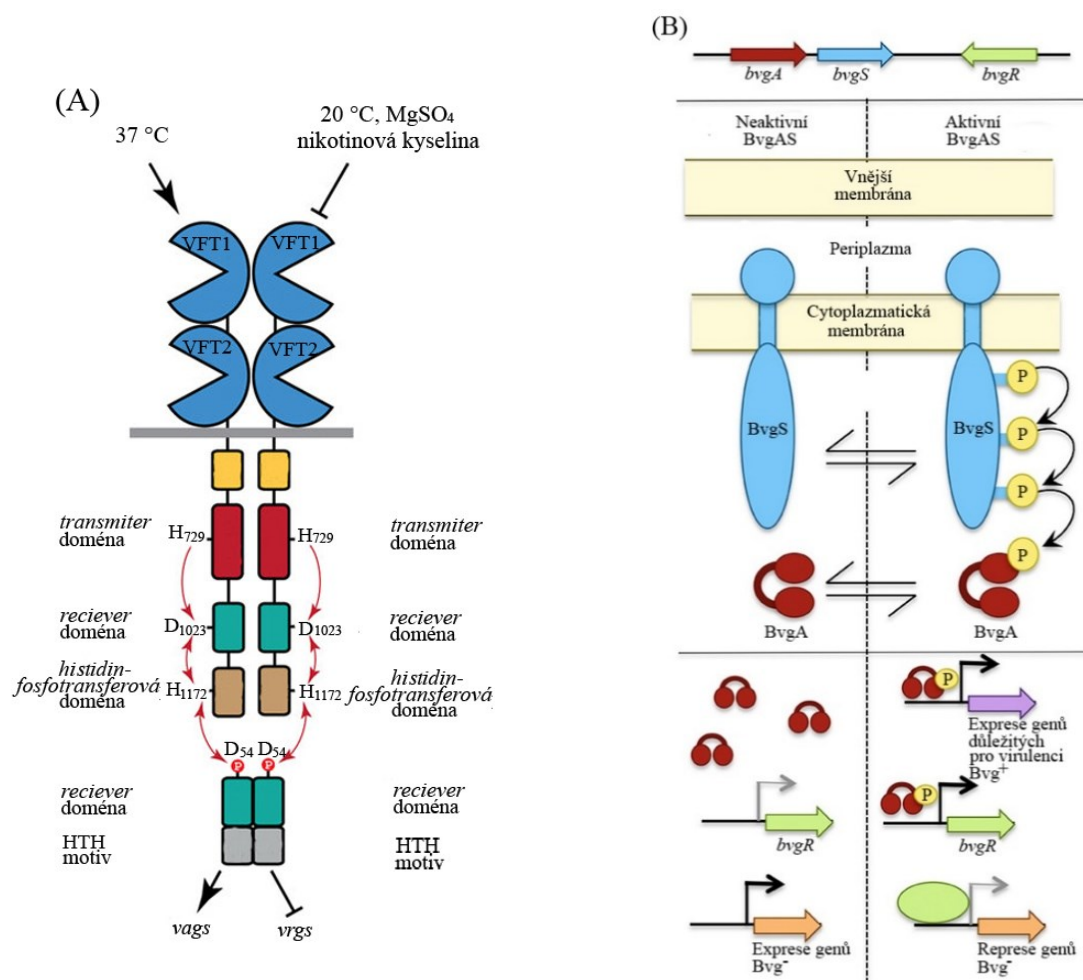
Zmíněný mechanismus umožňuje přechod *B. pertussis* mezi jednotlivými fázemi virulentního cyklu bakterie: virulentní Bvg^+ , avirulentní Bvg^- a intermediální Bvg^i a to v závislosti na vnějších podmínkách. Přítomnost $MgSO_4$ a kyseliny nikotinové vyvolává inaktivaci BvgAS, to následně způsobí přechod bakterií rodu *Bordetella* z virulentní Bvg^+ do avirulentní Bvg^- fáze. Dlouhou dobu se předpokládalo, že k inaktivaci vede také snížení teploty. Toto se ukázalo, že je závislé na sledovaném kmeni *Bordetelly*. U bakterie *B. pertussis* při snížení teploty na 24°C dochází stále k produkci faktorů virulence a nemění se ani složení mastných kyselin v membráně (což by mohlo přispívat k přenosu onemocnění mezi jedinci). Naopak u blízkého příbuzného druhu *B. bronchiseptica*, vede nízká teplota k inaktivaci BvgA, tedy k přechodu do avirulentní fáze. Virulentní fáze *B. bronchiseptica* nastane opět při zvýšení teploty na 37 °C (Seydlová *et al.* 2017).

Za nepříznivých podmínek se během přechodu do avirulentní fáze bakterie nejprve dostane do intermediální fáze Bvg^i . Ve fázi Bvg^i se nadále exprimují adheziny FHA a Fim, ale dochází

také k snížení exprese ACT, regulujícího mimo jiné schopnost vytvářet biofilm. V Bvgⁱ fázi se díky tomuto mechanismu tvoří velké množství biofilmu, důležitého v prvotní fázi kolonizace hostitele nebo pro přečkání nepříznivých podmínek (Irie *et al.* 2004). Po přechodu *B. pertussis* do Bvg⁺ fáze dochází k aktivaci *vags* genů. Mezi tyto geny patří i faktory virulence zapojené v procesu kolonizace hostitele včetně FHA, Fim, PRN, ACT, PTX, nebo geny pro proteiny sekrečního systému III a IV a také některé transkripční regulátory. Mezi nejznámější patří gen *brpL*, který kóduje sigma faktor modulující extracytoplazmatické funkce. Tento faktor funguje jako transkripční regulátor T3SS systému (Moon *et al.* 2017).

Faktory virulence jsou různě regulované podle typu jejich promotoru (časný, střední, pozdní). Z tohoto důvodu dochází např. k expresi FHA těsně po vniknutí do organismu, zatímco PTX vzniká až zhruba 3 hodiny poté. Typ promotoru pak poměrně přesně vymezuje dobu, kdy dochází k expresi genů pro faktory virulence, aby jejich kolonizační schopnost byla optimální (Kinnear *et al.* 2001). Nedávné studie ukazují, že pro správnou aktivaci BvgA, je potřebných více faktorů než jen fosforylace pomocí BvgS. Důležitou roli hraje VFT2 (Venus flytrap 2) doména vyskytující se v BvgS, tedy především její prolinový zbytek (Pro319), který pravděpodobně pomáhá držet BvgS v konformaci nezbytné pro správnou funkci domény. Mutantní kmeny *B. pertussis*, u kterých došlo k substituci prolinu za threonin, nevytváří pak některé faktory virulence řízené pomocí Bvg systému, mezi něž patří např. PTX, FHA nebo PRN potřebné pro kolonizace hostitele (Hiramatsu *et al.* 2017).

Důležitý je také gen *bvgR*, který se aktivuje po navázání fosforylovaného BvgA na jeho promotor. Protein BvgR, jak je vidět na **Obr. 2 (B)**, se podílí na represi genů *vrgs* (virulence-repressed genes), (Merkel *et al.* 2003). Regulace *vrgs* genů pomocí BvgR u myši se ukázala být důležitým faktorem, který významně zvyšoval úspěšnost infekce *B. pertussis* (Smith *et al.* 2001).



Obr. 2: Produkce *vags* a *vrgs* genů. (A) Aktivace BvgA se uskutečňuje fosforylací histidinu v pozici 729 na *transmitter* doméně transmembránového proteinu BvgS, která se přes aspartátový a histidinový zbytek na BvgS dostane až na aspartát proteinu BvgA. Během aktivace BvgA dochází k expresi *vags* genů mezi které patří i velké množství faktorů virulence potřebných pro kolonizaci hostitele. Největší produkce těchto genů je při 37 °C. Naopak nízká teplota či přítomnost MgSO₄ tlumí aktivaci, dochází k přechodu do Bvg⁻ fáze a expresi *vrgs* genů. Převzato a upraveno: (Dupré *et al.* 2015). (B) Aktivace *bvgR* navázáním fosforylovaného BvgA na jeho promotor a následné potlačení exprese *vrgs* genů. Převzato a upraveno: (Taylor-Mulneix *et al.* 2017).

Poslední dobou se zjišťuje, že i v avirulentní Bvg⁻ fázi dochází k expresi řady důležitých genů. Nejdůležitější je zvýšená exprese genů kódující proteiny potřebné pro přežívání bakterie mimo tělo hostitele, jedná se o proteiny chladového šoku a také proteiny zapojené do metabolických drah jako je metabolismus mastných kyselin, lipidů, syntézy LPS (lipopolysacharidy) a kapsulárních polysacharidů (Moon *et al.* 2017). Mimo to se zvyšuje také exprese genu pro adhezín Fim3, důležitého k přichycení bakterie na buňky hostitele (Moon *et al.* 2017). Gen *fim3* se může chovat jako *vag* i *vrg* gen. To je dáno tím, že existuje ještě jeden promotor pro tento gen, který je potlačován během Bvg⁺ fáze. Bylo zjištěno, že se i přes probíhající expresi v Bvg⁻ fázi, se Fim3 v buňce nehromadí. Pravděpodobně nedochází k jeho komplementaci, je nestabilní, protože mu chybí další složky vznikající pouze v Bvg⁺ fázi (Chen *et al.* 2018). Nedávno bylo dokonce potvrzeno, že pokud je *B. pertussis* v Bvg⁻ fázi, může na

svém povrchu vytvářet struktury podobné bičíku, ačkoliv se o ní dlouhou dobu předpokládalo, že není schopna aktivního pohybu. Tyto struktury a jejich případná role během infekce se však stále zkoumají (Hoffman *et al.* 2019).

3.4 Regulace virulence systémem RisAK

Další způsob regulace exprese faktorů virulence je kódován lokusem *ris* (*regulator of intracellular stress response*). Podobně jako systém Bvg obsahuje i systém Ris dva hlavní proteiny: RisA a RisS. U kmenů *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis* je protein RisA regulátor buněčné odpovědi, který je aktivovaný kinázou RisS. U kmene *B. pertussis* se však jedná o pseudogen (Stenson *et al.* 2005) a funkce kinázy je zprostředkována proteinem RisK. Nicméně nedojde-li k fosforylaci RisA, je aktivita tohoto proteinu podstatně snížena, ale zcela nevymizí. Pravděpodobně některé z genů regulované RisA nejsou na fosforylaci závislé (Coutte *et al.* 2016).

U kmene *B. bronchiseptica* je tento mechanismus důležitý pro rezistenci k oxidačnímu stresu a reguluje produkci kyselých fosfatázy, což umožňuje přežití uvnitř hostitele (Jungnitz *et al.* 1998).

U kmene *B. pertussis* za normálních podmínek (Bvg⁺ fáze) Ris systém mírně reguluje expresi mnoha *vrgs* genů, které nejsou regulované systémem BvgAS. Pokud dojde ke změně prostředí (např. přidáním MgSO₄, které je spojené s přechodem do Bvg⁻ fáze) je regulace systémem Ris výraznější. Je to dáno také nepřítomností BvgR proteinu, který funkci RisA utlumuje, proto k větší produkci *vrgs* genů dochází v Bvg⁻ fázi (Coutte *et al.* 2016).

4 Modely vhodné ke studiu patogenních organismů

Studium patogenních organismů se v posledních dekádách čím dál více orientuje na infekční experimenty probíhající v živých modelech, nebo na tkáňových kulturách.

V **živých modelech** (*in vivo* modely) se průběh bakteriální infekce asi nejvíce blíží reálné situaci, nicméně může být zatížen mnoha nedostatky. Mezi tyto nedostatky patří především fakt, že *B. pertussis* je striktně lidským patogenem a jakýkoliv zvířecí model není jejím přirozeným hostitelem. Ve většině případů pak nedochází k typickému projevu tohoto onemocnění – kašli, a následnému šíření onemocnění mezi dalšími jedinci. Další nevýhodou je statistická průkaznost, protože počet jedinců ve studii je většinou malý, případně i reprodukovatelnost experimentu se mezi různými kohortami zvířat může lišit. V posledních letech dochází navíc k minimalizování zvířecích pokusů. Pokud existuje jiné řešení, jsou tímto přístupem zvířecí modely nahrazovány. Přesto zůstávají tyto modely pro studium patogeneze *B. pertussis* nepostradatelné (Melvin *et al.* 2014).

Další možností využití infekčních modelů je studium na **tkáňových kulturách** (*in vitro* modely). Používají buď standardizované immortalizované buněčné linie, nebo primární buňky. Primární buňky z pacientů se opět více blíží reálné situaci, nicméně mají poměrně vysokou variabilitu a omezené zdroje. Naproti tomu tkáňové kultury mají výrazně nižší variabilitu a množství získaného materiálu je značné (Carter a Shieh, 2015). Z tohoto důvodu jsou velmi často využívány pro studium v laboratořích, i za cenu toho, že systém je značně zjednodušen.

Ideálním stavem by bylo vybrání infekčního experiment zkoumat na více modelech a eliminovat tak nedostatky jednotlivých používaných modelů. Experimenty provedené v tkáňových kulturách *in vitro* by ukázaly na obecné mechanismy patogeneze a tyto znalosti by posloužily pro srovnání či plánování pokusu na živém modelu.

4.1 *In vitro* infekční modely

Pro studium a porozumění interakce bakterie *B. pertussis* s hostitelem na buněčné úrovni se hojně používají *in vitro* modely. Získané informace se následně mohou v omezené míře aplikovat při plánování pokusech na zvířatech.

Na *in vitro* modelech se zkoumá i nedávno objevená schopnost bakterie přežívat uvnitř hostitelských buněk. Tato schopnost se zkoumá na (1) lidské monocytární linii THP-1 (Valdez *et al.* 2016), (2) primárních lidských makrofázích (Friedman *et al.* 1992; Lamberti *et al.* 2010), (3) myších primárních makrofázích (Hellwig *et al.* 1999) či buněčné linii MH-S z myších

alveolárních makrofágů (Schneider *et al.* 2000), (4) epiteliálních buňkách – příkladem je lidská buněčná epiteliální linie A549 získaná z plic (Lamberti *et al.* 2013).

4.1.1 Lidské primární buněčné monocytární linie

Na primárních monocytech se zkoumala celá řada buněčných mechanismů spojená s infekcí *B. pertussis*. Jedním z nich jsou **změny v prezentaci antigenu** hostitelskými buňkami po infekci *B. pertussis*. Přítomnost PTX (spolu se sníženou produkcí IFN γ) a dalších komponent bakterie snižuje expresi kostimulační molekuly CD86 (přítomné na povrchu APC) a proteinu HLA-DR (MHC glykoprotein II. třídy, na povrchu APC) na buněčném povrchu. Na MHC glykoprotein I. třídy, který se také podílí na prezentaci antigenu, však působení bakterie nemělo žádný vliv (Shumilla *et al.* 2004). Úbytek molekul na povrchu APC je spojený se slabší aktivací Th buněk.

Během experimentů je důležitá schopnost uměle vyvolané diferenciaci primárních monocytárních buněk na makrofágy, které mají vysokou schopnost fagocytózy. Pro diferenciaci se využívají stimulační látky např. M-CSF faktor (macrophage colony-stimulating factor) nebo GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Primární monocyty mohou navíc diferencovat i do DC, které mohou vznikat také z hematopoetické kmenové buňky kostní dřeně, působením GM-CSF a IL-4 (Ohradanova-Repic *et al.* 2016).

Po napadení hostitele je *B. pertussis* pravděpodobně schopná zabránit diferenciaci primárních monocytů do zralých makrofágů působením ACT. Dochází k vysoké produkci cAMP, který blokuje expresi makrofágových markerů a ponechává monocytární marker CD14. ACT, v malé míře PTX, může dokonce způsobit dediferenciaci makrofágů zpět na monocyty. Snížený počet makrofágů by mohl přispět dlouhodobějšímu přežití bakterie v hostiteli (Ahmad *et al.* 2019). Působením ACT dochází i ke snížení maturace DC (diferenciovaných z primárních monocytů). Nevytvoří se zralá APC (antigen presenting cell) indukující imunitní odpověď proti patogenu, dochází k zeslabení Th1 imunitní odpovědi a snazšímu přežití bakterie v hostiteli (Fedele *et al.* 2010).

Na *in vitro* infekčních modelech se zkoumá i **schopnost bakterie přežívat uvnitř fagocytů**. Ačkoliv se o bakterii *B. pertussis* dlouhou dobu předpokládalo, že se jedná o typického extracelulárního patogena, ve druhé polovině 20. století se prvně objevila studie o intracelulární lokalizaci této bakterie (Crawford a Fishel, 1959). V roce 1992 Friedman a kol. prokázali první dlouhodobé přežití *B. pertussis* v makrofázích *in vitro*. Lokalizace bakterie

v intracelulárním prostředí by mohla hrát důležitou roli v patogenezi černého kašle, proto je v posledních letech předmětem řady vědeckých studií.

Na modelu primárních makrofágů zjistil Lamberti a kol. (2010), že již po 20 minutách po infekci *B. pertussis* bylo 35 % makrofágů infikováno. Důležitou roli hraje lysozomální degradace intracelulárně přítomných bakterií. Ve většině případů dochází k dokončení této cesty a eliminaci bakterií v pozdním endozomu či lysozomu. Část bakterií se degradační cestě vyhýbá a přežívá v časných endozomech, jejichž pH se pohybuje okolo neutrálního či mírně kyselého. Po 48 hodinách po infekci dokonce zaznamenali zvýšený počet bakterií uvnitř makrofágů, což by mohlo ukazovat na možnou replikaci bakterií uvnitř hostitelských buněk.

I v případě *B. parapertussis* se zkoumala možnost přežívání této bakterie uvnitř lidských makrofágů. Zjistilo se, že pro lokalizaci a přežití bakterie v nekyselých kompartmentech je vyžadovaná přítomnost O antigenu (složka LPS), který brání fagolysosomálnímu zrání. *B. parapertussis* tedy může přežívat dlouhodobě uvnitř lidských makrofágů, a dokonce získávat i extracelulární živiny pro své přežívání (Gorgojo *et al.* 2014).

4.1.2 THP-1 buňky

THP-1 linie se i přes vysokou podobnost od primárních monocytů v řadě významných parametrů liší. Primární buňky se vyznačují vyšší hladinou CD14 receptoru, a tak se snadno separují pomocí průtokové cytometrie (Mittar *et al.* 2011), zatímco monocytární lidská buněčná linie THP-1 má tohoto receptoru jen malé množství (Aldo *et al.* 2014). Při testování vlivu LPS na indukci produkce IL-8 v primárních monocytech, THP-1 buňkách a CD14-transfekovaných THP-1 buňkách se ukázalo, že i u transfekovaných linií dochází k o řád nižší produkci IL-8 než u primárních monocytů (Bosshart a Heinzelmann, 2016). I přes tyto limity, které se ukázaly v tomto konkrétním experimentu, zůstávají THP-1 buňky vhodným a využívaným modelem pro studium vlivu LPS na monocyty. THP-1 buňky jsou díky stabilnímu genetickému základu a reprodukovatelné odpovědi na experimentální stimuly velmi vhodné ke screeningovým účelům (Hu *et al.* 2016). K experimentům se využívají makrofágy diferenciované z monocytární linie THP-1, které se mění působením PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (Feng *et al.* 2004; Park *et al.* 2007). PMA je analogem DAG (diacylglycerol), který působí na proteinkinázu C a ovlivňuje tak další buněčné pochody vedoucí ke změně na makrofágy.

Na THP-1 buňkách se převážně zkoumá schopnost intracelulárního přežívání *B. pertussis* v hostiteli. Na rozdíl od primárních monocytů není tento model zatížen omezeným počtem či variabilitou buněk. Pokusy s THP-1 buňkami se potvrdila intracelulární lokalizace bakterie

B. pertussis v časných endozomech i možná replikace buněk uvnitř buněk, která byla už dříve popsána u primárních makrofágů (Valdez *et al.* 2016).

Při studiu THP-1 buněk si pozornost získal také protein *B. pertussis* BP0414 a to díky jeho homologii s proteinem MtgC zapojeným do intracelulárního přežití u jiných patogenů. Ukázalo se, že tento protein je důležitý pro růst bakterie v prostředí s nízkým obsahem Mg^{2+} či v mírně kyselém prostředí (Cafiero *et al.* 2018). Proteinů zapojených v intracelulárním přežívání *B. pertussis* je celá řada a po průniku bakterie do intracelulárního prostředí dochází u mnoha proteinů zapojených do virulence ke zvýšení jejich exprese (Lamberti *et al.* 2016).

Na základě srovnání mutantů a divokého typu bakterie *B. pertussis* se předpokládalo, že k přežívání bakterie uvnitř buněk přispívají i ACT a PTX (Lamberti *et al.* 2016; Valdez *et al.* 2016). Výsledky nové studie však ukazují, že řada faktorů virulence (včetně genů kódujících PTX) nebo exprese *bvgR* regulačních genů byla utlumena. Recentní výsledky rovněž poukazují na přechod *B. pertussis* do avirulentní fáze v intracelulárním prostředí, čímž se ukazuje, že avirulentní fáze má pravděpodobně větší význam, než se původně předpokládalo (Petráčková *et al.* 2020).

Intracelulární lokalizace bakterie vede ke změně exprese proteinů i u hostitelských buněk. Dochází k vyšší expresi genů zapojených do různých metabolických drah, transkripčních regulátorů nebo cytokinů a chemokinů, jejichž signalizace je důležitá pro aktivaci imunitní odpovědi (Petráčková *et al.* 2020).

4.1.3 Myší fagocytární buňky

Přežívání *B. pertussis* se zkoumá kromě lidských imunitních buněk i na myších fagocytech. Při pokusech na primárních **myších makrofázích** se předpokládalo, že bakterie *B. pertussis* vstupují do buněk pomocí faktorů virulence FHA a PTX, ve kterých jsou následně schopné nějakou dobu přežít. (Hellwig *et al.* 1999).

Pokusy na buněčné linii MH-S však dlouhodobé přežití *B. pertussis* uvnitř fagocytů vyloučily. Po pohlcení *B. pertussis* fagocyty dochází k její lokalizaci do pozdních endozomů/lysozomů, ve kterých dochází k okyselení prostředí, jenž je pro *B. pertussis* (na rozdíl od blízce příbuzné *B. bronchiseptica*) smrtelné (Schneider *et al.* 2000).

4.1.4 Epiteliární buněčná linie A549

Průběh infekce v epiteliálních buňkách A549 (plicní epiteliární buněčná linie) probíhá podobně jako v makrofázích. Bylo prokázáno, že bakteriální buňky jsou schopné vstupovat do

hostitelských epiteliálních buněk. Po ošetření antibiotikem polymyxinem B došlo k eliminaci extracelulárních bakterií a intracelulárních bakterií lokalizovaných do pozdních endozomů či lysozomů. Část bakterií byla však lokalizována v časných endozomech, ve kterých mohou přežít (replikace bakterií zde však nebyla detekována). Tyto bakterie byly schopny znovu osídlit extracelulární prostředí, ve kterém už nebyl přítomný polymyxin B. Tento mechanismus by mohl významně přispívat k patogenezi bakterie (Lamberti *et al.* 2013).

4.1 *In vivo* infekční modely (zvířecí modely)

B. pertussis je sice striktně lidský patogen, přesto zvířecí modely výrazně přispěly lepšímu pochopení chování *B. pertussis* v hostitelském organismu a následné reakci napadených tkání.

Zvířecí model představuje komplexní systém a získané poznatky jsou často využity při tvorbě vakcín. Nejvíce používaným zvířecím modelem je myš a to i přes některé nedostatky jako je odlišný imunitní systém a chybějící typický příznak nemoci – kašel (Mills *et al.* 2014). Více člověku podobný model je prase, u kterého je onemocnění doprovázené kašlem, výtoky z nosu, obtížným dýcháním či horečkou (Elahi *et al.* 2005). Nejpodobnější model člověku je pavián. Jeho teplota těla je stejná jako u lidí a k onemocnění dochází u všech infikovaných jedinců (Warfel *et al.* 2012a). Přenos infekce mezi zvířaty je obdobný jako je tomu u lidí (Warfel *et al.* 2012b). Jeho nevýhodou je, že starší jedinci mohou získat proti černému kašli rezistenci, a proto by se měla využívat jen mláďata.

4.1.1 Zvířecí model - myš

Na myším modelu se testuje schopnost bakterií *B. pertussis* přežít v hostiteli, nebo vliv bakteriálních faktorů virulence na kolonizaci dýchacích cest. Podobně jako u lidí je i u myši větší závažnost onemocnění u novorozných myší. Je to způsobeno především působením PTX, který podporuje kolonizaci hostitele, leukocytózu a další změny, které mohou končit i smrtí infikovaného jedince (Scanlon *et al.* 2017). Kolonizace dýchacího traktu myši spojená s projevy onemocnění nastává v Bvg⁺ fázi. Za méně příznivých podmínek, ve kterých se *B. pertussis* nachází v Bvgⁱ fázi, dochází ke kolonizaci pouze nosní dutiny, nikoliv plic, odkud je bakterie rychle odstraněna (Lesne *et al.* 2018). Hypotézu, že novorozené myši jsou citlivější na infekci *B. pertussis* podpořil fakt, že se mezi nimi onemocnění mohlo šířit oproti dospělým jedincům. O tomto způsobu šíření onemocnění se do té doby předpokládalo, že je možné jen u modelu paviánů (Scanlon *et al.* 2017).

Myší modely se také využívají při zkoumání imunitních odpovědí hostitele, které jsou vyvolané po vakcinaci nebo po infikování vybraných jedinců bakteriemi. Existuje totiž vysoká korelace účinnosti podané wP či aP vakcíny mezi myším modelem a dětskými pacienty (Mills *et al.* 1998). Jak již bylo výše zmíněno, wP a aP vakcína se liší (viz **Kap. 3.2.1**) především rozdílnou indukcí typu Th pomocných buněk, kdy wP vakcína navíc indukuje i tkáňově rezidentní paměťové T lymfocyty, které zabraňují kolonizaci nosní dutiny. Tyto paměťové T lymfocyty mohou být přeneseny z uzdravených jedinců, nebo jedinců imunizovaných wP vakcínou, do naivních jedinců, u kterých přispívají rychlejšímu odstranění bakterie produkcí IL-17 a IFN γ (Wilk *et al.* 2019). Oba typy vakcíny vyvolaly také vysokou indukci protilátek IgG spojenou s vytvořením paměťových B lymfocytů. IgG protilátky byly v organismu hojně zastoupeny po dobu 3 měsíců, poté došlo k jejich rychlému úbytku a po 6-9 měsících už nebyly v organismu detekovatelné. Stále však obě vakcíny zaručovaly vyšší míru ochrany a nižší přítomnost bakterií v plicích než u kontrolních nevakcinovaných myší. Ochrana myší před infekcí *B. pertussis* vyvolaná wP vakcínou byla krátce po podání vakcíny a po 10 měsících obdobná, naopak po aplikaci aP vakcíny účinnost v čase klesala. Tyto výsledky poukazují na účinnost obou typů vakcín krátce po jejich podání, ale lepší dlouhodobou ochranu před infekcí *B. pertussis* poskytuje wP vakcína (Mahon *et al.* 2000).

Na myším modelu se zkoumala i účinnost nově vznikající vakcíny BPZE1. Myši očkované jednou dávkou vakcíny BPZE1 vykazovaly snížený počet bakterií 3 hodiny po infekci a silnou ochranu spojenou s téměř nedetekovatelným počtem bakterií v organismu 7 dní po infekci (Mielcarek *et al.* 2010).

Na myších modelech se zkoumala vzájemná kompetice mezi *B. pertussis* a *B. parapertussis*, které mohou současně kolonizovat stejného jedince. Vakcíny používané proti infekci *B. pertussis* mají ale na *B. parapertussis* jiný vliv. Jedinci očkovaní aP vakcínou nejsou chráněni proti infekci *B. parapertussis* (Long *et al.* 2010), wP vakcína zvyšuje ochranu (David *et al.* 2004) a nejlépe před infekcí *B. parapertussis* chrání vakcína BPZE1 (Mielcarek *et al.* 2006).

Pro odstranění *B. pertussis* z dýchacího traktu myši jsou důležité, kromě T a B lymfocytů či makrofágů, i NK buňky produkující IFN γ . NK buňky jsou aktivované více cestami, jednou z nich je např. produkce IL-12 dendritickými buňkami. NK buňky navíc podporují Th1 imunitní odpověď a při jejich úbytku dochází ke zvyšování Th2 imunitní odpovědi (Byrne *et al.* 2004).

4.1.2 Zvířecí model - prase

Průběh černého kašle v prasečím modelu je více podobný onemocnění vyvolaného u lidí než například v myším modelu, z tohoto důvodu se prasečí model hojně využívá při vývoji vakcín. Jedna z připravovaných vakcín je zaměřena na novorozence, kteří mají ve svém těle ještě mateřské protilátky, jež by mohly negativně ovlivnit imunitní odpověď vyvolanou očkováním. Připravovaná vakcína by měla posílit Th1 imunitní odpověď účinnou i v přítomnosti mateřských protilátek (Polewitz *et al.* 2013).

Prasečí model se využil při testování dalšího potenciálního způsobu léčby, pasivní imunizace z matky na plod. Selata prasnic naočkovaných před porodem produkují protilátky specifické pro *B. pertussis*, a to IgA a IgG, a proto jsou selata z naočkovaných matek odolnější vůči infekci *B. pertussis* (Elahi *et al.* 2006a).

Studie směřují i na aplikaci antimikrobiálních peptidů (např. beta defensinu 1), které novorozená selata neprodukují a mohou být důležité pro navození účinné imunitní odpovědi a snížení onemocnění prasat (Elahi *et al.* 2006b).

Na modelu prasat se studuje i onemocnění zvané atopická rhinitida, které je v některých případech způsobeno bakterií *B. bronchiseptica* (Coward *et al.* 1989). Zjistilo se, že za projevy tohoto onemocnění je zodpovědný především dermonekrotický toxin (DNT), který je bakterií produkován. Přítomnost DNT má vliv na zvýšení teploty infikovaných jedinců, zvýšení počtu bakterií *B. bronchiseptica* v nosní dutině, a především vyvolání turbinární atrofie spojené s epiteliální změnou (např. ztrátou řasinek) a kostní změnou spojenou s resorbcí turbinátové kosti (zkrácení a deformace čenichu), (Brockmeier *et al.* 2002).

4.1.3 Zvířecí model - pavián

Na modelu paviánů se zkoumá odlišné působení aP a wP vakcíny nebo možný přenos bakterií *B. pertussis* mezi jedinci, který je způsoben (podobně jako u lidí) respiračními kapičkami aerosolu přítomných ve vzduchu (Warfel *et al.* 2012b). U jedinců očkovaných wP vakcínou došlo k rychlejšímu odstranění *B. pertussis* z těla a snížení infekce v oblasti nosohltanu, čímž se zamezilo přenosu a infekci jiných jedinců. Naopak po očkování aP vakcínou byli nakažení jedinci nevykazující žádné příznaky onemocnění schopni infikovat naivní jedince v jejich blízkosti (Warfel *et al.* 2014a; 2015). Po podání aP vakcíny těhotným matkám paviánů ve třetím trimestru došlo k ochraně novorozenců v prvních týdnech života (Warfel *et al.* 2014b).

Model paviana se podobně jako myší model využil při testování nově vznikající vakcíny BPZE1. Vakcína BPZE1 dobře chrání před příznaky onemocnění černého kašle, tak i před kolonizací nosohltanu, čímž zamezuje šíření infekce mezi jedinci a překonává problém současně používané aP vakcíny (Locht *et al.* 2017).

5 Závěr

Nárůst výskytu černého kašle v lidské populaci i přes vysokou proočkovanost ve vyspělých státech během posledních let výrazně zvyšuje zájem o studium jeho původce - bakterii *B. pertussis*, popř. dalších zástupců tohoto rodu *Bordetella*, jako je *B. parapertussis*, nebo zvířecí patogen *B. bronchiseptica*.

Pro lepší porozumění reakce hostitele na infekci *B. pertussis* se využívají zvířecí či *in vitro* modely. Snahou posledních let je preference studia na tkáňových kulturách a eliminace zvířecích modelů. Nicméně tyto modely jsou stále v mnoha směrech nezastupitelné a data z obou systémů se vhodně doplňují.

Na zvířecích modelech se v posledních letech zkoumá především imunitní odpověď vyvolaná aplikací vakcín. V současné době používaná aP vakcína vyvolává především Th2 imunitní odpověď, která není tak účinná pro odstranění bakterie z těla, a tak může dojít k množení a přenosu bakterií i přes očkování touto vakcínou. V současnosti se tak zkoumají především alternativní možnosti ochrany – přenos paměťových T lymfocytů, přenos protilátek z očkovaných matek na dítě během těhotenství, antimikrobiální peptidy, nebo nově vyvíjená vakcína BPZE1. Tyto možnosti by mohly v budoucnu zajistit vyšší míru ochrany před onemocněním černým kašlem.

Na buněčných liniích, převážně buňkách imunitního systému, se zkoumá nedávno objevená schopnost bakterie *B. pertussis* intracelulárního přežívání v časných endozomech fagocytů. Některé studie poukazují i na možnost bakterie se v časných endozomech replikovat. Intracelulární přežívání by mohlo přispívat perzistenci patogena v hostiteli a s tím souvisejících komplikacích při léčbě. Lokalizace bakterie uvnitř buněk vyžaduje modulaci exprese celé řady genů. Zájemem mnoha studií je i mechanismus, kterým *B. pertussis* přežívá uvnitř buněk. Stále není dořešeno, zda jsou potřeba faktory virulence (ACT, PTX), nebo se bakterie nachází v klidové, avirulentní fázi. Nedávná práce Rivera a kol. (2019) navíc poukazuje na to, že intracelulární přežívání bakterie není specifické pouze pro *B. pertussis*, nýbrž pro všechny bakterie rodu *Bordetella*.

Cílem této bakalářské práce bylo podrobněji popsat průběh infekce kmenem *Bordetella* se zaměřením na její studium na zvířecích a *in vitro* modelech. Perzistence *B. pertussis* v lidských makrofázích se zdá být závažným problémem pro léčbu, a proto v této práci ucelené teoretické poznatky budou využity pro plánování dalších experimentů zaměřených na odpověď jak patogena, tak hostitelské buňky.

6 Přehled použité literatury

(Review označené *)

- Ahmad J.N., Holubova J., Benada O., Kofronova O., Stehlik L., Vasakova M., Sebo P. 2019.** Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Inhibits Monocyte-to-Macrophage Transition and Dedifferentiates Human Alveolar Macrophages into Monocyte-like Cells. *mBio* 10(5): e01743-19.
- Aldo P.B., Racicot K., Craviero V., Guller S., Romero R., Mor G. 2014.** Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *Am J Reprod Immunol* 72(3): 270–284.
- Andreasen C., Powell D.A., Carbonetti N.H. 2009.** Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to Bordetella pertussis infection in mice. *PLoS One* 17;4(9): e7079.
- Bergfors E., Trollfors B., Taranger J., Legergard T., Sundh V., Zackrisson G. 1999.** Parapertussis and pertussis: Differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int J Infect Dis* 3(3): 140-146.
- Bosshart H., Heinzelmann M. 2016.** THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med* 4(21): 438.
- Brockmeier S.L., Register K.B., Magyar T., Lax A.J., Pullinger G.D., Kunkle R.A. 2002.** Role of the dermonecrotic toxin of Bordetella bronchiseptica in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect Immun* 70(2): 481-490.
- Byrne P., McGuirk P., Todryk S., Mills K.H. 2004.** Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with Bordetella pertussis associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol* 34(9): 2579-88.
- Cafiero J.H., Lamberti Y.A., Surmann K., Vecerek B., Rodriguez M.E. 2018.** A Bordetella pertussis MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLoS One* 13(8): e0203204.
- Carbonetti N.H., Artamonova G.V., Mays R.M., Worthington Z.E. 2003.** Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by Bordetella pertussis. *Infect Immun* 71(11): 6358-6366.
- Carbonetti N.H., Artamonova G.V., Van Rooijen N., Ayala V.I. 2007.** Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract. *Infect Immun* 75(4): 1713-1720.
- Cerny O., Anderson K.E., Stephens L.R., Hawkins P.T., Sebo P. 2017.** cAMP Signaling of Adenylate Cyclase Toxin Blocks the Oxidative Burst of Neutrophils through Epac-Mediated Inhibition of Phospholipase C Activity. *J Immunol* 198(3): 1285-1296.
- Cerny O., Kamanova J., Masin J., Bibova I., Skopova K., Sebo P. 2015.** Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol* 194(10): 4901-4913.
- Connelly C.E., Sun Y., Carbonetti N.H. 2012.** Pertussis toxin exacerbates and prolongs airway inflammatory responses during Bordetella pertussis infection. *Infect Immun* 80(12): 4317-4332.
- Coutte L, Alonso S, Reveneau N, Willery E, Quatannens B, Loch C, Jacob-Dubuisson F. 2003.** Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med* 197(6): 735-742.

- Coutte L., Antoine R., Drobecq H., Loch C., Jacob-Dubuisson F. 2001.** Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* 20(18): 5040–5048.
- Coutte L., Ludovic H., Antoine R., Slupek S., Merkel T.J., Chen Q., Stibitz S., Hot D., Loch C. 2016.** The multifaceted *RisA* regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep.* 6: 32774.
- Cowart R.P., Bäckström L., Brim T.A. 1989.** *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. *Can J Vet Res* 53(3): 295–300.
- David S., van Furth R., Mooi F.R. 2004.** Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine* 22(15-16).
- *Decker K.B., Tamara D.J., Stibitz S., Hinton D.M. 2012.** The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology.* 158(Pt 7): 1665–1676.
- Dirix V., Verscheure V., Goetghebuer T., Hainaut M., Debie A.S., Loch C., Mascart F. 2009.** Monocyte-derived interleukin-10 depresses the *Bordetella pertussis*- specific gamma interferon response in vaccinated infants. *Clin Vaccine Immunol* 16(12): 1816-1821.
- Ducours M., Rispal P., Danjean M.P., Imbert Y., Dupont E., Traissac E.M., Grosleron S. 2017.** *Bordetella bronchiseptica* infection. *Med Mal Infect* 47(7): 453-458.
- Dupré E., Herrou J., Lensink M.F., Wintjens R., Vagin A., Lebedev A., Crosson S., Villeret V., Loch C., Antoine R., Jacob-Dubuisson F. 2015.** Virulence regulation with Venus flytrap domains: structure and function of the periplasmic moiety of the sensor-kinase BvgS. *PLoS Pathog* 11(3): e1004700.
- Eby J.C., Gray M.C., Hewlett E.L. 2014.** Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun* 82(12): 5256-5269.
- Elahi S., Brownlie R., Korzeniowski J., Buchanan R., O'Connor B., Peppler M.S., Halperin S.A., Lee S.F., Babiuk L.A., Gerdts V. 2005.** Infection of newborn piglets with *Bordetella pertussis*: a new model for pertussis. *Infect Immun* 73(6): 3636-45.
- Elahi S., Buchanan R.M., Attah-Poku S., Townsend H. G., Halperin S. A., abiuk L. A., Gerdts V. 2006b.** The host defense peptide beta-defensin 1 confers protection against *Bordetella pertussis* in newborn piglets. *Infect Immun* 74(4): 2338-2352.
- Elahi S., Buchanan R.M., Babiuk L.A., Gerdts V. 2006a.** Maternal immunity provides protection against pertussis in newborn piglets. *Infect Immun* 74(5): 2619–2627.
- Elahi S., Thompson D.R., Strom S., O'Conner B., Babiuk L.A., Gerdts V. 2008.** Infection with *Bordetella parapertussis* but not *Bordetella pertussis* causes pertussis-like disease in older pigs. *J Infect Dis* 198(3): 384-92.
- Fabiánová K., Zavadilová J., Šebestová H., Beneš Č., Kříž B. 2015.** Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2014 – rozbor epidemiologické situace. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA)* 24(5).
- Farizo K.M., Huang T., Burns D.L. 2000.** Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68(7): 4049–4054.
- Fedele G., Spensieri F., Palazzo R., Nasso M., Cheung G. Y., Coote J.G., Ausiello C.M. 2010.** *Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PLoS One* 5(1): e8734.

- Feng Y.H., Zhu Y.N., Liu J., Ren Y.X., Xu J.Y., Yang Y.F., Li X.Y., Zou J.P. 2004.** Differential regulation of resveratrol on lipopolysacchride-stimulated human macrophages with or without IFN-gamma pre-priming. *Int Immunopharmacol.* 4(6): 713-720.
- Fennelly N.K., Sisti F., Higgins S.C., Ross P.J., van der Heide H., Mooi F.R., Boyd A., Mills K.H. 2008.** *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* 76(3): 1257-66.
- Fiser R, Masín J, Basler M. Krusek J., Spuláková V. Konopásek I., Sebo P. 2007.** Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem.* 282(5): 2808-2820.
- Flak T.A., Goldman W.E. 1999.** Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* 1: 51-60.
- Friedman R.L., Nordensson K., Wilson L., Akporiaye E.T., Yocum D.E. 1992.** Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 60(11): 4578-4585.
- Geuijen C.A., Willems R.J., Hoogerhout P., Puijk W.C., Meloen R.H., Mooi F.R. 1998.** Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66(5): 2256–2263.
- Geuijen C.A., Willems R.J., Mooi F.R. 1996.** The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* 64(7): 2657-2665.
- *Goodnow R.A. 1980.** Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev* 44: 722-738
- Goodwin M.S.M., Weiss A.A. 1990.** Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun* 58(10): 3445-3447.
- Gorgojo J., Harvill E.T., Rodríguez M.E. 2014.** *Bordetella parapertussis* survives inside human macrophages in lipid raft-enriched phagosomes. *Infect Immun* 82(12): 5175–5184.
- *Gorringe A.R., Vaughan T.E. 2014.** *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13(10): 1205-1214.
- Guermonprez P., Khelef N., Blouin E., Rieu P., Ricciardi-Castagnoli P., Guiso N., Ladant D., Leclerc C. 2001.** The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193(9): 1035-1044.
- Hamidou Soumana I., Linz B., Harvill E.T. 2017.** Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Front Microbiol* 8: 28.
- Hazenbos W.L., Geuijen C.A., van den Berg B.M., Mooi F.R., van Furth R. 1995.** *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J Infect Dis* 171(4): 924-929.
- Hazenbos W.L., van den Berg B.M., van Furth R. 1993.** Very late antigen-5 and complement receptor type 3 cooperatively mediate the interaction between *Bordetella pertussis* and human monocytes. *J Immunol* 151(11): 6274-6282.
- Heiss L.N., Moser S.A., Unanue E.R., Goldman W.E. 1993.** Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* 61(8): 3123-3128.

- Hellwig S.M., Hazenbos W.L., van de Winkel J.G., Mooi F.R. 1999.** Evidence for an intracellular niche for *Bordetella pertussis* in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26(3-4): 203-207.
- Hellwig S.M., Rodriguez M.E., Berbers G.A., van de Winkel J.G., Mooi F.R. 2003.** Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J Infect Dis* 188(5): 738-742.
- Hiramatsu Y., Yoshino S., Yamamura Y., Otsuka N., Shibayama K., Watanabe M., Kamachi K. 2017.** The proline residue at position 319 of BvgS is essential for BvgAS activation in *Bordetella pertussis*. *Pathog Dis* 75(1).
- Hoffman C, Eby J, Gray M, Heath Damron F., Melvin J., Cotter P., Hewlett E. 2017.** *Bordetella* adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro. *Mol Microbiol* 103(2): 214-228.
- Hoffman C.L., Gonyar L.A., Zacca F., Sisti F., Fernandez J., Wong T., Damron F.H., Hewlett E.L. 2019.** *Bordetella pertussis* Can Be Motile and Express Flagellum-Like Structures. *mBio* 10(3): e00787-19.
- Hou W., Wu Y., Sun S., Shi M., Sun Y., Yang C., Pei G., Zhong C., Sun B. 2003.** Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells. *J Immunol* 170(4): 1728-1736.
- Hu Z.D., Wei T.T., Tang Q.Q., Ma. N., Wang L.L., Qin B.D., Yin J.R., Zhou L., Zhonh R.Q. 2016.** Gene expression profile of THP-1 cells treated with heat-killed *Candida albicans*. *An Transl Med* 4(9): 170.
- Chen Q., Lee G., Craig C., Ng V., Carlson P.E., Jr, Hinton D.M., Stibitz S. 2018.** A Novel Bvg-Repressed Promoter Causes vrg-Like Transcription of fim3 but Does Not Result in the Production of Serotype 3 Fimbriae in Bvg- Mode *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 200(20): e00175-18.
- Inatsuka C.S., Xu Q., Vujkovic-Cvijin I., Wong S., Stibitz S., Miller J.F., Cotter P.A. 2010.** Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun* 78(7): 2901-2909.
- Irie Y., Mattoo S., Yuk M.H. 2004.** The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 186(17): 5692-5698.
- Jungnitz H., West N.P., Walker M.J., Chhatwal G.S., Guzmán C.A. 1998.** A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun* 66(10): 4640-4650.
- Katada T., Tamura M., Ui M. 1983.** The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys* 224(1): 290-298.
- Khelef N., Zychlinsky A., Guiso N. 1993.** *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61(10): 4064-4071.
- Kinnear S.M., Marques R.R., Carbonetti N.H. 2001.** Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect Immun* 69(4): 1983-1993.
- Kirimanjeswara G.S., Agosto L.M., Kennett M.J., Bjornstad O.N., Harvill E.T. 2005.** Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of *Bordetella pertussis*. *J Clin Invest* 115(12): 3594-601.
- Kroes M.M., Mariman R., Hijdra D., Hamstra H.J., van Boxtel K.J.W.M., van Putten J.P.M., de Wit J., Pinelli E. 2019.** Activation of Human NK Cells by *Bordetella pertussis* Requires Inflammasome Activation in Macrophages. *Front Immunol* 10: 2030.

- Krueger K.M., Barbieri J.T. 1993.** Molecular characterization of the in vitro activation of pertussis toxin by ATP. *J Biol Chem* 268(17): 12570-12578.
- Lamberti Y., Gorgojo J., Massillo C., Rodriguez M.E. 2013.** Bordetella pertussis entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog Dis* 69(3): 194-204.
- Lamberti Y.A., Cafiero J.H., Surmann K., Valdez H., Holubova J., Večerek B., Sebo P., Schmidt F., Völker U., Rodriguez M.E. 2016.** Proteome analysis of Bordetella pertussis isolated from human macrophages. *J Proteomics* 136: 55-67.
- Lamberti Y.A., Hayes J.A., Perez Vidakovics M.L., Harvill E.T., Rodriguez M.E. 2010.** Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infect Immun* 78(3): 907-13.
- Leininger E., Roberts M., Kenimer J.G., Charles I.G., Fairweather N., Novotny P., Brennan M.J. 1991.** Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 345-349.
- Lesne E., Coutte L., Solans L., Slupek S., Debie A.S., Dhennin V., Froguel P., Hot D., Locht C., Antoine R., Dubuisson F.J. 2018.** Distinct virulence ranges for infection of mice by Bordetella pertussis revealed by engineering of the sensor-kinase BvgS. *PLoS One* 13(10): e0204861.
- Lin A., Apostolovic D., Jahnmatz M., Liang F., Tecleab T., Wu C. van Hage M., Solovay K., Rubin K., Locht C., Thorstensson R., Thalen M., Loré K. 2020.** Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. *J Clin Invest* 130(5): 2332-2346.
- *Locht C., Antoine R., Jacob-Dubuisson F. 2001.** Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4: 82-89.
- Locht C., Papin J.F., Lecher S., Debie A.S., Thalen M., Solovay K., Rubin K., Mielcarek N. 2017.** Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against Bordetella pertussis Disease and Infection. *J Infect Dis* 216(1): 117-124.
- Long G.H., Karanikas A.T., Harvill E.T., Read A.F., Hudson P.J. 2010.** Acellular pertussis vaccination facilitates Bordetella parapertussis infection in a rodent model of bordetellosis. *Proc Biol Sci* 277(1690): 2017-25.
- Mahon B.P., Brady M.T., Mills K.H. 2000.** Protection against Bordetella pertussis in mice in the absence of detectable circulating antibody: implications for long-term immunity in children. *J Infect Dis* 181(6): 2087-2091.
- Martin S.W., Pawloski L., Williams M., Weening K., DeBolt C. Qin X., Reynolds L., Kenyon C., Giambrone G., Kudish K., Miller L., Selvage D., Lee A., Skoff T.H., Kamiya H., Cassidy P.K. Tondella M.L. Clark T.A. 2015.** Pertactin-negative Bordetella pertussis strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis* 60(2): 223-227.
- *Mattoo S., Foreman-Wykert A.K., Cotter P.A., Miller J.F. 2001.** Mechanisms of Bordetella pathogenesis. *Front Biosci* 6: e168-e186.
- *Mattoo S., Cherry J.D. 2005.** Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 326-382.
- *Melvin J.A., Scheller E.V., Miller J.F., Cotter P.A. 2014.** Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* 12(4): 274-288.

- Merkel T.J., Boucher P.E., Stibitz S., Grippe V.K. 2003.** Analysis of bvgR Expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 185(23): 6902–6912.
- Mielcarek N., Debie A.S., Raze D., Bertout J., Rouanet C., Younes A.B., Creusy C., Engle J., Goldman W.E., Locht C. 2006.** Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog* 2(7): e65.
- Miller E., Waight P.A., Ashword L.A.E., Robinson A., Irons L.I. 1991.** Phase II trial of whole-cell pertussis vaccine vs an acellular vaccine containing agglutinogens. *Lancet* 337: 70-73.
- *Mills K.H., Gerdt V. 2014.** Mouse and pig models for studies of natural and vaccine-induced immunity to *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 209 Suppl 1: S16-S19.
- *Mills K.H., Ross P.J., Allen A.C., Wilk M.M. 2014.** Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis?. *Trends Microbiol* 22(2): 49-52.
- Mills K.H., Ryan M., Ryan E., Mahon B.P. 1998.** A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66(2): 594–602.
- Mittar D., Paramban R., McIntyre C. 2011.** Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. Application Note. BD Biosciences 20.
- Mooi F.R., van Loo I.H., van Gent M., He Q., Bart M.J., Heuvelman K.J., de Greeff S.C., Diavatopoulos D., Teunis P., Nagelkerke N., Mertsola J. 2009.** *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 15(8): 1206-13.
- Moon K., Bonocora R.P., Kim D.D., Chen Q., Wade J.T., Stibitz S., Hinton D.M. 2017.** The BvgAS Regulon of *Bordetella pertussis*. *mBio* 8(5): e01526-17.
- Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer MB, Stockinger H. 2016.** Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clin Transl Immunology* 5(1): e55.
- Paddock C.D., Sanden G.N., Cherry J.D., Gal A.A., Langston C., Tatti K.M., Wu K.H., Goldsmith C.S., Greer P.W., Montague J.L., Eliason M.T., Holman R.C., Guarner J., Shieh W.J., Zaki S.R. 2008.** Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis* 47(3): 328-338.
- Park E.K., Jung H.S., Yang H.I., Yoo M.C., Kim C., Kim K.S. 2007.** Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 56(1): 45-50.
- Parkhill, J., Sebaihia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., Holden M.T., Churcher C.M., Bentley S.D., Mungall K.L., Cerdeno-Tarraga A.M., Temple L., James K., Harris B., Quail M.A., Achtman M., Atkin R., Baker S., Basham D., Bason N., Cherevach I., Chillingworth T., Collins M., Cronin A., Davis P., Doggett J., Feltwell T., Goble A., Hamlin N., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Norberczak H., O'Neil S., Ormond D., Price C., Rabinowitsch E., Rutter S., Sanders M., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Unwin L., Whitehead S., Barrell B.G., Maskell D.J. 2003.** Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35: 32-40.
- Petrácková D., Farman M.R., Amman F., Linhartová I., Dienstbier A., Kumar D., Držmíšek J., Hofacker I., Rodriguez M.E., Večerek B. 2020.** Transcriptional profiling of human macrophages during infection with *Bordetella pertussis*. *RNA Biol* 17(5): 731-742.

- Pilione M.R., Harvill E.T. 2006.** The *Bordetella bronchiseptica* type III secretion system inhibits gamma interferon production that is required for efficient antibody-mediated bacterial clearance. *Infect Immun* 74(2): 1043-1049
- Plaut R.D., Carbonetti N.H. 2008.** Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell. *Cell Microbiol* 10(5): 1130–1139.
- Polewicz M., Gracia A., Garlapati S., van Kessel J., Strom S., Halperin S.A., Hancock R.E., Potter A.A., Babiuk L.A., Gerdts V. 2013.** Novel vaccine formulations against pertussis offer earlier onset of immunity and provide protection in the presence of maternal antibodies. *Vaccine* 31(31): 3148-55.
- Porter J.F., Connor K., Donachie W. 1996.** Differentiation between human and ovine isolates of *Bordetella parapertussis* using pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 135: 131-135
- Prasad S.M., Yin Y., Rodzinski E., Tuomanen E.I., Masure H.R. 1993.** Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 61(7): 2780-2785
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock D.T, Saukkonen K, Wright S.D. 1990.** Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell*. 61(7): 1375-1382.
- Rivera I., Linz B., Dewan K.K., Ma L., Rice C.A., Kyle D.E., Harvill, E.T. 2019.** Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence Among Animal Pathogenic *Bordetellae*. *Front Microbiol* 10: 2839
- Rogel A., Hanski E. 1992.** Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem* 267(31): 22599-605.
- Ross P.J., Sutton C.E., Higgins S., Allen A.C., Walsh K., Lavelle E.C., McLoughlin R.M., Mills K.H. 2013.** Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog* 9(4): e1003264.
- Scanlon K.M., Snyder Y.G., Skerry C., Carbonetti N.H. 2017.** Fatal Pertussis in the Neonatal Mouse Model Is Associated with Pertussis Toxin-Mediated Pathology beyond the Airways. *Infect Immun* 85(11): e00355-17.
- Selwa E., Davi M., Chenal A., Sotomayor-Pérez A.C., Ladant D., Malliavin T.E. 2014.** Allosteric activation of *Bordetella pertussis* adenyl cyclase by calmodulin: molecular dynamics and mutagenesis studies. *J Biol Chem* 289(30): 21131-41.
- Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., Deora R. 2011.** FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PloS one* 6(12): e28811.
- Seydlova G., Beranova J., Bibova I., Dienstbier A., Drzmisek J., Masin J., Fiser R., Konopasek I., Vecerek B. 2017.** The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J Biol Chem* 292(19): 8048–8058.
- Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. 1999.** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189(11): 1777–1782.
- Shumilla J.A. Lacaille V., Hornell T.M. C., Huang J., Narasimhan S., Relman R.A., Mellins E.D. 2004.** *Bordetella pertussis* infection of primary human monocytes alters HLA-DR expression. *Infect Immun* 72(3): 1450-1462.

- Scheller E.V., Melvin J.A., Sheets A.J., Cotter P.A. 2015.** Cooperative roles for fimbria and filamentous hemagglutinin in *Bordetella* adherence and immune modulation. *mBio* 6(3): e00500-e515.
- Schneider B., Gross R., Haas A. 2000.** Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun* 68(12): 7039–7048.
- Schwartz K.L., Kwong J.C., Deeks S.L., Campitelli M.A., Jamieson F.B., Marchand-Austin A., Stukel T.A., Rosella L., Daneman N., Bolotin S., Drews S.J., Rilkoff H., Crowcroft N.S. 2016.** Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. *CMAJ* 188(16): E399-E406.
- Skinner J.A., Pilione M.R., Shen H., Harvill E.T., Yuk M.H. 2005.** *Bordetella* type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence. *J Immunol* 175(7): 4647-4652.
- *Smith A.M., Guzmán C.A., Walker M.J. 2001.** The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* 25(3): 309-333.
- Stenson T.H., Allen A.G., Al-Meer J.A., Maskell D., Peppler M.S. 2005.** *Bordetella pertussis* *risA*, but not *risS*, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun* 73(9): 5995-6004.
- *Taylor-Mulneix D.L., Hamidou Soumana I., Linz B., Harvill E.T. 2017.** Evolution of *Bordetellae* from Environmental Microbes to Human Respiratory Pathogens: Amoebae as a Missing Link. *Front Cell Infect Microbiol*. 7: 510.
- Uhl M.A., Miller J.F. 1994.** Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 1163–1167.
- Uhl M.A., Miller J.F. 1996a.** Central Role of the BvgS Receiver as a Phosphorylated Intermediate in a Complex Two-component Phosphorelay. *EMBO J* 15(5): 1028–1036.
- Uhl M.A., Miller J.F. 1996b.** Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *J Biol Chem* 271(52): 33176-80.
- Valdez H.A., Oviedo J.M., Gorgojo J.P., Lamberti Y., Rodriguez M.E. 2016.** *Bordetella pertussis* modulates human macrophage defense gene expression. *Pathog Dis* 74(6): pii: ftw073.
- Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., Merkel T.J. 2012a.** Nonhuman primate model of pertussis. *Infect Immun* 80: 1530–1536.
- Warfel J.M., Beren J., Merkel T.J. 2012b.** Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 206(6): 902-906.
- Warfel J.M., Papin J.F., Wolf R.F., Zimmerman L.I., Merkel T.J. 2014b.** Maternal and Neonatal Vaccination Protects Newborn Baboons From Pertussis Infection. *J Inf Dis* 210: 604–610.
- Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. 2014a.** Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 787-792.
- Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. 2015.** Comparison of Three Whole-Cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis. *Clin Vaccine Immunol* 23: 47–54.
- Wilk M.M., Borkner L., Misiak A., Curham L., Allen A.C., Mills K.H.G. 2019.** Immunization with whole cell but not acellular pertussis vaccines primes CD4 T_{RM} cells that sustain protective immunity against nasal colonization with *Bordetella pertussis*. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1): 169-185.

Xu Z., Octavia S., Luu L.D.W., Payne M., Timms V., Tay C.Y., Keil A.D., Sintchenko V., Guiso N., Lan R. 2019. Pertactin-Negative and Filamentous Hemagglutinin-Negative *Bordetella pertussis*, Australia, 2013-2017. *Emerg Infect Dis* 25(6): 1196-1199.

Z knihy:

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. 1999. Lékařská mikrobiologie. Marvil, pp. 257.

Carter M., Shieh J.C. 2015. Cell Culture Techniques. Guide to Research Techniques in Neuroscience, pp. 295-310.

Votava. 2003, Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, pp. 39-42.